

Biologia Ambientale, **17** (2): 45-52, 2003

Vitalità e caratterizzazione chimico-fisica dei pollini come indicatori di inquinamento atmosferico

Elena Gottardini^{1*}, Paolo Lazzeri², Giancarlo Pepponi³, Fabiana Cristofolini¹, Eva Carli²

¹ Istituto Agrario di San Michele all'Adige, via Mach, 2 - 38010 San Michele all'Adige, Trento, Italia

² Istituto Trentino di Cultura - Centro per la Ricerca Scientifica e Tecnologica, via Sommarive, 18, 38050 Povo, Trento, Italia

³ Atominstytut der Österreichischen Universitäten, Stadionallee 2, 1020 Vienna, Austria

* referente per la corrispondenza (Fax 0461 650956; elena.gottardini@mail.ismaa.it)

Pervenuto il 6.11.2002, accettato il 16.5.2003

Riassunto

Nel 2002 sono state effettuate analisi chimico-fisiche e biologiche su pollini di *Corylus avellana*, *Betula pendula* e *Pinus nigra* per verificare la possibilità di utilizzare il polline come bioindicatore nella stima degli effetti dell'inquinamento atmosferico. I campioni sono stati prelevati da due stazioni inquinate e da due di controllo, scelte sulla base dell'esito di uno studio preliminare basato sulla biodiversità dei licheni epifiti come bioindicatore. La vitalità dei pollini è stata valutata trattandoli con 2,3,5 trifenil-tetrazolio-cloruro (TTC) e diacetato di fluoresceina (FDA) mentre, per rivelare e quantificare specie chimiche elementari, sono state effettuate misure di spettrometria di massa (ToF-SIMS) e di fluorescenza X indotta in riflessione totale (TXRF). I risultati hanno mostrato una buona concordanza tra attività biologica del polline di *C. avellana* e *P. nigra* e ambiente di provenienza, evidenziando valori di vitalità più elevati nelle stazioni di controllo rispetto a quelle alterate. I campioni provenienti dai siti inquinati sono inoltre risultati caratterizzati da un contenuto anomalo di sodio –spesso presente a livelli molto elevati in singoli granuli del campione considerato– e di alluminio. Il polline di *B. pendula* sembra invece essere poco adatto a rappresentare la situazione ambientale nella quale si è sviluppato.

PAROLE CHIAVE: bioindicatori / inquinamento atmosferico / polline / analisi ToF-SIMS / analisi TXRF / vitalità

Abstract

Viability and chemico-physical characterisation of pollen as indicators of atmospheric pollution

Chemical and biological characterisation of *Corylus avellana*, *Betula pendula* and *Pinus nigra* pollen samples was carried out to evaluate the use of pollen as a bioindicator of the effects of atmospheric pollution. In this study attention was focused on two sites, representing a polluted and a control site respectively. Site selection was based on the results of a preliminary study of the biodiversity of epiphytic lichens as bioindicator. Part of the pollen samples were treated with TTC (2,3,5 Tryphenil-Tetrazolium-Chloride) staining solution and FDA (Fluorescein Diacetate) solution and subsequently analysed to estimate viability. In addition, using untreated samples, Secondary Ion Mass Spectrometry (ToF-SIMS) and Total Reflection X-Ray Fluorescence (TXRF) were employed to evaluate the chemical composition of the pollen. The results showed that pollen viability is clearly affected by environmental factors. In fact, the pollen of *C. avellana* and *P. nigra* from the control site exhibited higher viability compared to the pollen from the polluted site. For the pollen of the same taxa, samples from the polluted site showed an anomalous content of Al, Cu and Na. Moreover, there was a large variation of sodium among pollen grains. Pollen of *B. pendula* seemed inadequate as bioindicator, mainly because of contamination by many extraneous particles.

KEY WORDS: bioindicators / atmospheric pollution / pollen / ToF-SIMS / TXRF / viability

INTRODUZIONE

La presenza nell'aria di uno o più contaminanti e i loro effetti sinergici, possono causare un danno agli esseri umani, agli animali e alle piante, nonché il deterioramento di materiali, manufatti e opere d'arte. La valutazione dell'inquinamento atmosferico viene solitamente effettuata attraverso l'analisi delle concentrazioni di determinate sostanze presenti nell'aria; questo approccio non consente tuttavia di valutare l'impatto sull'ambiente e, in particolare, sulla componente biologica. A tale scopo risultano utili tecniche di biomonitoraggio che saggiino gli effetti dell'inquinamento su particolari organismi (LOPPI *et al.*, 1996; CISLAGHI e NIMIS, 1997; NIMIS, 1999; LOPPI *et al.*, 2002; BARGAGLI *et al.*, 1997; LORENZINI, 1999; PORRINI, 1999; CASTELLO *et al.*, 1999). La possibilità di ottenere indicazioni sugli effetti degli inquinanti atmosferici attraverso misure dell'attività biologica del polline è stata ipotizzata da molti autori (WOLTERS e MARTENS, 1987; BELLANI *et al.*, 1988; COMTOIS e SCHEMENAUER, 1991; COMTOIS e PERFETTO, 1996; KRISTEN, 1997; IANNOTTI *et al.*, 2000; ONORARI *et al.*, 2000). I granuli pollinici sono organismi fragili che interagiscono costantemente con l'ambiente attraverso le loro aperture. Il polline maturo, pronto per essere rilasciato dalla pianta, è disidratato e di conseguenza altamente igroscopico, cosicché può assorbire l'umidità dell'atmosfera; se questa contiene inquinanti, il polline, assorbendo l'acqua, entra in contatto con tali sostanze che possono influenzare la sua vitalità (COMTOIS, 1994), ovvero la sua capacità di completare gli eventi post-pollinazione e di compiere la fecondazione (SHIVANNA e RANGASWAMY, 1992). La vitalità del polline può essere perciò ritenuta un indice attendibile delle condizioni ambientali. Polline di *Pinus pinea* proveniente da un'area urbana a elevato inquinamento atmosferico ha mostrato una riduzione nella germinabilità e un minor sviluppo del tubetto pollinico, oltre ad anomalie morfologiche, rispetto a polline raccolto in una zona non inquinata (CELA RENZONI *et al.*, 1990). L'inibizione della crescita del tubetto pollinico da parte di inquinanti atmosferici è stata verificata anche per *Nicotiana tabacum* (FLÜCKIGER *et al.*, 1978), *Pinus nigra*, *P. sylvestris* e, in misura minore, *P. mugo* e *Abies alba* (KELLER e BEDA, 1984).

La capacità d'allungamento dei tubetti pollinici decresce anche all'aumentare dell'acidità, fino a risultare inibita a valori di pH prossimi a 4 (SIDHU, 1983; VAN RYN *et al.*, 1986; BELLANI *et al.*, 1988; PAOLETTI, 1990).

COMTOIS e PERFETTO (1996) hanno constatato una correlazione tra vitalità pollinica e concentrazioni di NO, NO₂, CO ed SO₂; ALAIMO *et al.* (1996) segnalano effetti fitotossici da metalli pesanti su polline di *Cupressus sempervirens* e descrivono alterazioni morfo-

giche di alcune specie polliniche in presenza di inquinamento (1998): *Pinus pinea*, ad esempio, mostra una iper-produzione di polline con granuli piccoli ed immaturi adesi a granuli normali, assenza di una delle due sacche, corpo centrale rotto.

È di rilevante importanza l'osservazione che inquinanti atmosferici presenti in elevate quantità determinano modificazioni qualitative nelle proteine di parete dei granuli pollinici, con ipotizzabili riflessi sull'allergenicità (RUFFIN *et al.*, 1983).

Con il presente lavoro si è inteso proseguire uno studio intrapreso nel corso del 2001 (GOTTARDINI e CRISTOFOLINI, in stampa), integrando le analisi della vitalità del polline con quelle della composizione chimica; l'obiettivo primario è verificare la dipendenza delle caratteristiche chimiche e funzionali del polline rispetto alla qualità e al livello di inquinamento dell'ecosistema dove la pianta cresce. Questo approccio potrà anche fornire informazioni specificatamente riconducibili alla presenza di sostanze potenzialmente dannose per la salute (es. metalli pesanti).

MATERIALI E METODI

Area di studio e raccolta dei campioni

L'indagine è stata condotta in 4 stazioni nel territorio comunale di Trento. La strategia adottata per l'individuazione delle stazioni mirava a rappresentare due situazioni a diverso livello di inquinamento atmosferico; a tale scopo ci si è avvalsi dell'esito di una precedente indagine sulla qualità dell'aria effettuata applicando l'indice di biodiversità lichenica (IBL) (GOTTARDINI e CRISTOFOLINI, 2002). Sulla base di questi dati, due stazioni sono state individuate in zone con elevata intensità di traffico autoveicolare e valori di biodiversità lichenica inferiori a 20 (stazioni alterate: A1 e A2) e due in zone scarsamente trafficate e con valori di biodiversità lichenica superiori a 40 (stazioni naturali: N1 e N2).

In ciascuna stazione sono state prese in considerazione 3 specie vegetali: *Corylus avellana*, *Betula pendula* e *Pinus nigra*. La scelta di queste specie è stata dettata dai criteri di buona presenza sul territorio indagato; elevata produzione di polline, con conseguente facilità di raccolta; fioriture in momenti diversi dell'anno.

Per ciascuna specie è stato scelto l'individuo più vicino agli alberi sui quali era stata rilevata la biodiversità lichenica, entro un raggio massimo di 100 metri. Solo nella stazione A2 non è stato possibile individuare piante di *C. avellana*.

Il polline è stato raccolto da parti diverse della pianta, quando questa risultava in piena fioritura (Tab. 1).

Il giorno stesso della raccolta il polline è stato

Tab. 1. Stazioni di raccolta di polline, data di raccolta e stadio fenologico delle piante.

I tre simboli dello stato fenologico si riferiscono, nell'ordine, ai fiori in boccio, ai fiori sbocciati e ai fiori appassiti (+: presente; 0: assente).

STAZIONI		<i>Corylus avellana</i>		<i>Betula pendula</i>		<i>Pinus nigra</i>	
		data raccolta	stadio fenologico	data raccolta	stadio fenologico	data raccolta	stadio fenologico
alterate	A1	11/02/02	+++	26/03/02	++0	02/05/02	+++
	A2			26/03/02	+++	03/05/02	+++
naturali	N1	11/02/02	++0	27/03/02	++0	07/05/02	+++
	N2	17/02/02	++0	14/04/02	+++	21/05/02	++0

setacciato utilizzando un setaccio con maglia di 100 µm e su una parte di polline fresco di ogni campione sono stati effettuati i test di vitalità. Il restante polline, riposto in provette tipo Eppendorf in polipropilene, è stato disidratato in essiccatore con gel di silice per circa 10 giorni e poi conservato a 3-4 °C; questi campioni sono stati successivamente utilizzati per le analisi chimico-fisiche. La disidratazione dei campioni è necessaria per ridurre la probabilità che i singoli granuli formino aggregati macroscopici che renderebbero difficoltosa la successiva caratterizzazione chimica.

Analisi biologiche

Sul polline fresco sono stati eseguiti due test per stimarne la vitalità.

Test del tetrazolio (TTC test)

Si basa sulla riduzione del sale di tetrazolio 2,3,5-trifenil-tetrazolio cloruro (TTC), un colorante biologico che rivela l'attività respiratoria: in presenza di deidrogenasi, il TTC, da incolore, si trasforma in una sostanza rossa insolubile, il formazano (SHIVANNA e RANGASWAMY, 1992). Il polline appena raccolto viene sparso su un vetrino porta oggetti e bagnato con una goccia di soluzione di TTC (si prepara una soluzione di TTC al 10% e si diluisce in rapporto 1 a 9 con una soluzione di saccarosio al 60%); il tutto va poi coperto il più rapidamente possibile con un vetrino coprioggetti. In queste fasi è necessario che i preparati restino esposti all'ossigeno ed alla luce il meno possibile. Ogni campione è stato quindi posto al buio e dopo 24 ore è stato esaminato al microscopio ottico, osservando almeno 400 granuli pollinici ed annotando i granuli vitali –quelli cioè che hanno reagito al test assumendo una colorazione da rosa pallido a rosso intenso– e quelli non vitali, rimasti incolori.

Test di reazione fluorocromatica (FCR test)

Accerta l'integrità del plasmalemma della cellula vegetativa e la presenza di attività esterasica; si utilizza diacetato di fluoresceina (FDA), un composto non polare e non fluorescente che attraversa facilmente le membrane biologiche. Le esterasi citoplasmatiche idrolizzano FDA con rilascio di fluoresceina che si accu-

mula nel citoplasma dei granuli pollinici vitali, conferendo una fluorescenza verde o giallastra (SHIVANNA e RANGASWAMY, 1992). Una piccola parte di ogni campione di polline è stata mescolata a una soluzione di saccarosio 0,5 M. Su un vetrino sono state distribuite alcune gocce di soluzione di FDA (2 mg di FDA in 10 ml di acetone), lasciando poi asciugare per 30-40 secondi al fine di consentire l'evaporazione dell'acetone. Al vetrino sono state aggiunte alcune gocce del polline in sospensione nella soluzione di saccarosio e il tutto è stato mescolato e coperto con un vetrino coprioggetti. Dopo circa 5 minuti i campioni sono stati osservati con un microscopio a fluorescenza per la conta dei granuli fluorescenti su un totale di almeno 400 granuli pollinici.

Analisi chimico-fisiche

Per la rivelazione e quantificazione di elementi chimici sono state condotte misure di spettrometria di massa di ioni secondari (ToF-SIMS) (BENNINGHOVEN, 1985; VICKERMAN e BRIGGS, 2001) e misure di fluorescenza X indotta in riflessione totale (TXRF). Queste tecniche analitiche sono dotate di sensibilità appropriata per la rivelazione di specie atomiche presenti a livello di traccia e consentono la rivelazione parallela di molti elementi della tavola periodica. ToF-SIMS e XRF/TXRF hanno inoltre numerose prerogative complementari che consentono di ottenere una caratterizzazione complessiva di questo tipo di campioni. In particolare, ToF-SIMS è stato utilizzato per valutare qualitativamente la distribuzione laterale superficiale e sub-superficiale di elementi alcalini, alcalino terrosi, alogeni e con massa atomica < 28 amu mentre TXRF è stato utilizzato per derivare una misura quantitativa integrale per tutte le specie con massa > 28 amu.

Le analisi ToF-SIMS sono state eseguite su campioni adesi su un supporto bi-adesivo (*tape* in grafite), a sua volta incollato su un supporto in silicio. La preparazione dei campioni per l'analisi ToF-SIMS è stata ottimizzata per ottenere un singolo strato di granuli di polline: l'adesione dei grani è stata effettuata per semplice contatto con la superficie del *tape*, in modo da ridurre la contaminazione del polline da parte dei

composti adesivi, ed il materiale in eccesso è stato rimosso tramite flusso di azoto. Le misure sono state effettuate con uno strumento ToF-SIMS IV (commercializzato da ION-TOF GmbH, Muenster, Germania) utilizzando un fascio primario di ioni Ga (25 keV) in modalità "burst" e rivelando gli ioni secondari positivi. Per la compensazione della carica elettrica indotta è stato impiegato un fascio di elettroni. L'area analizzata, pari a 300x300 μm^2 , contiene mediamente un centinaio

di grani di polline.

Per l'analisi TXRF, a circa 5 mg di polline disidratato sono stati aggiunti 200 μL di acqua ultra pura e 50 μL di una soluzione di gallio come standard interno. Un'aliquota di 2-3 μL della sospensione così ottenuta è stata deposta su un riflettore in quarzo; il campione è stato essiccato sotto vuoto e poi analizzato. Per l'analisi quantitativa è stata assunta una sospensione omogenea in modo da poter calcolare la massa di campione e di standard interno depositati sul riflettore; è stato poi ottenuto un dato quantitativo tramite fattori di sensibilità sperimentali. Per ogni campione sono state eseguite due misure. Lo spettrometro TXRF usato è stato costruito presso l'Atominstut der Österreichischen Universitäten; la sorgente è costituita da un tubo da diffrazione a fuoco fine (0,4 x 8 mm) con anodo in molibdeno.

Analisi statistica

Per valutare l'esistenza di differenze statisticamente significative tra le due differenti situazioni ambientali (inquinato e controllo), i dati di vitalità e degli elementi sono stati analizzati attraverso l'uso del test non parametrico di Kolmogorov-Smirnov. I valori percentuali di vitalità pollinica sono stati precedentemente sottoposti a trasformazione angolare $Y = \arcsen[\text{radq}(\%/100)]$.

RISULTATI

In figura 1 sono rappresentati i valori percentuali di pollini vitali delle tre specie analizzate, relativi al test del tetrazolio (TTC test) ed alla reazione fluorocromatica (FCR test).

Si può notare che la risposta di *B. pendula* non coincide con quanto atteso: i dati di vitalità delle stazioni naturali ottenuti con il TTC test si sovrappongono parzialmente a quelli delle stazioni alterate; con il test FCR la vitalità relativa alle stazioni naturali risulta addirittura più bassa di quella registrata per le stazioni alterate. L'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative tra i dati di vitalità relativi alle due differenti situazioni ambientali ($p > 0,1$). Problematica si è rivelata anche l'analisi ToF-SIMS e TXRF poiché in questi campioni erano presenti innumerevoli particelle estranee che hanno condizionato la riproducibilità del risultato analitico, rendendo inattendibile il confronto dei dati. Per questi motivi i dati di vitalità relativi a *B. pendula* non sono stati considerati per le successive elaborazioni statistiche.

La vitalità pollinica di *C. avellana* e *P. nigra*, stimata con i test TTC e FCR, sembra invece risentire dell'ambiente di provenienza: nelle stazioni inquinate la vitalità è infatti statisticamente inferiore ($P < 0,05$) rispetto a quella delle stazioni di controllo (Fig. 2).

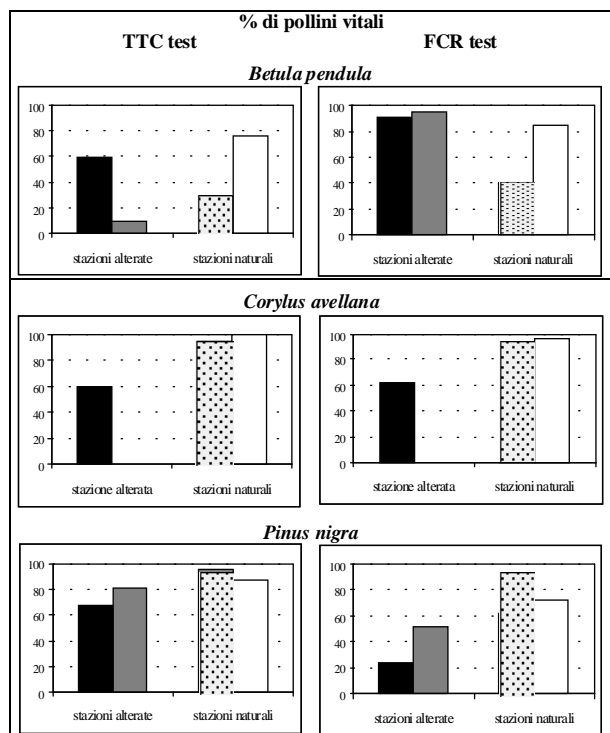


Fig. 1. Valori percentuali di pollini vitali ai test TTC e FCR dei tre taxa pollinici considerati, raccolti nelle stazioni A1 (nero), A2 (grigio scuro), N1 (punteggiato) e N2 (bianco).

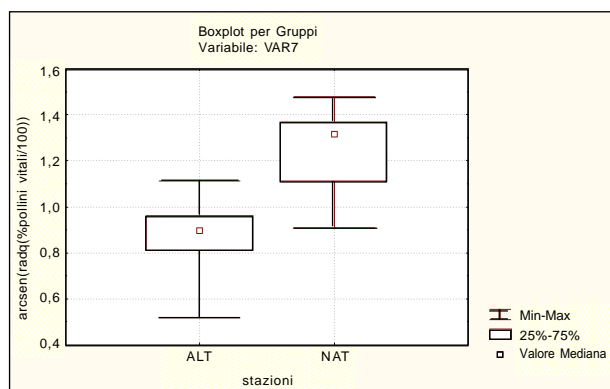


Fig. 2. Analisi statistica descrittiva (valori minimo, massimo, mediana e intervallo interquartile) dei dati di vitalità pollinica rilevati nelle stazioni alterate (ALT) e in quelle di controllo (NAT).

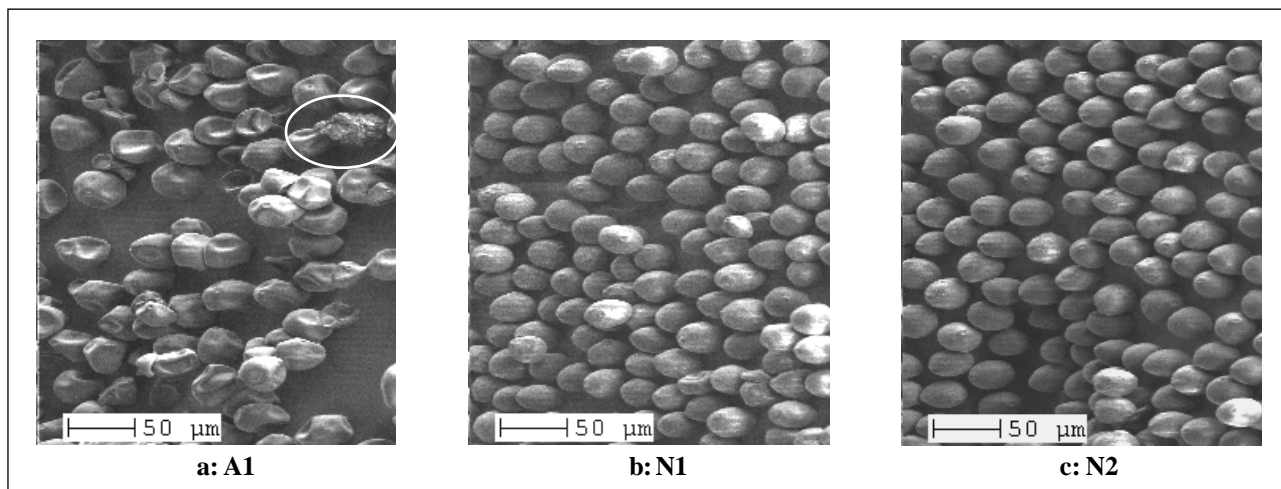


Fig. 3. Immagini morfologiche (secondary electron image) dei campioni di *Corylus avellana*. Nell'ovale è evidenziata una particella estranea.

I granuli pollinici di *C. avellana* prelevati nei diversi siti hanno evidenziato anche notevoli differenze morfologiche (Fig. 3): quelli provenienti dalla stazione A1 avevano dimensioni tendenzialmente superiori rispetto a quelli delle stazioni N1 e N2, nonché una forma irregolare. La caratteristica più evidente rilevata dall'analisi ToF-SIMS è l'elevato tenore in sodio e alluminio in rapporto alla quantità di calcio per il campione prelevato nella stazione A1 (Fig. 4). Il tenore relativo di Mg è invece inferiore rispetto a quanto si osserva per i campioni provenienti dalle due stazioni naturali. I pollini prelevati in questi due siti mostrano peraltro una composizione chimica molto simile tra loro per quanto riguarda il tenore relativo di potassio, magnesio e alluminio, mentre si osserva una concentrazione relativamente bassa di sodio nel campione prelevato nella stazione N1. I tenori relativi di sodio, magnesio, potassio e alluminio relativi ai campioni pollinici delle stazioni naturali sono risultati statisticamente differenti ($p < 0,001$) da quelli della stazione alterata.

All'analisi TXRF (Fig. 5), il campione pollinico proveniente dalla stazione alterata ha inoltre fatto rilevare concentrazioni più elevate di titanio, ferro, stronzio e piombo rispetto alle stazioni naturali; nei campioni corrispondenti, infatti, la concentrazione di questi elementi è inferiore al limite di rilevabilità della tecnica. Le immagini ioniche riportate nella figura 6 mostrano le intensità degli elementi più abbondanti nei singoli granuli di polline dei campioni prelevati nelle stazioni A1 (a) e N1 (b): sodio, magnesio e potassio sono distribuiti uniformemente nei granuli pollinici della stazione N1 e in maniera molto eterogenea tra i singoli granuli della stazione A1 (il segnale dell'alluminio evidenzia la presenza di una particella estranea).

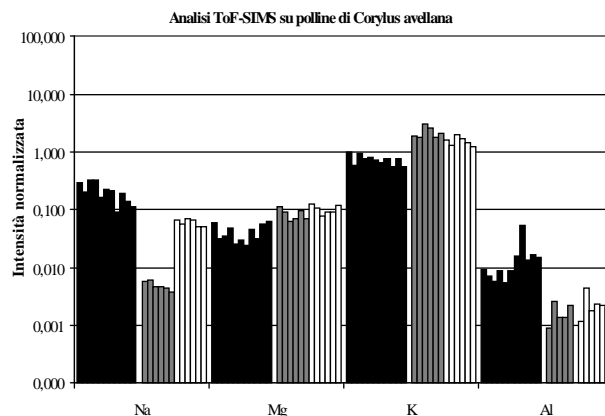


Fig. 4. Valori medi di intensità dei segnali degli elementi maggioritari nei campioni di *Corylus avellana*: A1 (nero), N1 (punteggiato), N2 (bianco). Le intensità sulle ordinate sono normalizzate rispetto all'intensità del segnale di ^{40}Ca . I singoli valori medi corrispondono all'analisi di circa un centinaio di granuli pollinici.

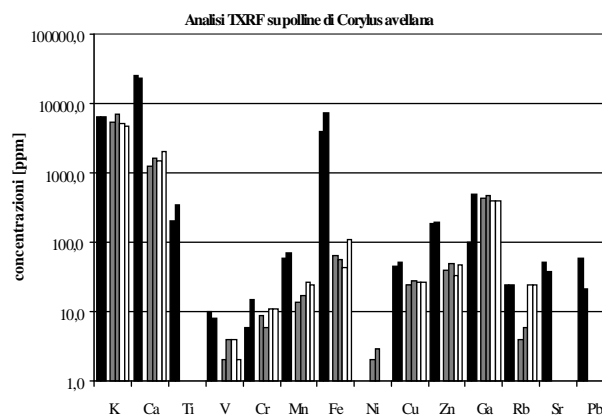


Fig. 5. Concentrazioni degli elementi rilevati con analisi TXRF nei campioni di polline di *Corylus avellana*: A1 (nero), N1 (punteggiato), N2 (bianco).

In figura 7 sono mostrate le immagini morfologiche dei pollini di *P. nigra*; in questo caso i pollini provenienti dalle diverse stazioni non sono caratterizzati da differenze di forma o dimensione apprezzabili. In generale, l'intensità del segnale in questi campioni è inferiore rispetto a quanto osservato per *C. avellana*, il che induce a supporre che la concentrazione assoluta degli elementi nel polline di *P. nigra* sia più bassa rispetto al caso considerato in precedenza.

L'intensità dei segnali ToF-SIMS dei diversi elementi è rappresentata in figura 8. Dall'esame comparato dei valori mostrati nelle figure 4 e 8 si osserva che i campioni di *P. nigra* sono caratterizzati da un contenuto relativo di potassio tendenzialmente più elevato di quello osservato per i campioni di *C. avellana*. Questo elemento risulta il più abbondante in entrambi i casi e tale dato è confermato anche dalle analisi TXRF. Confrontando i grafici in figura 5 e figura 9 emerge che le

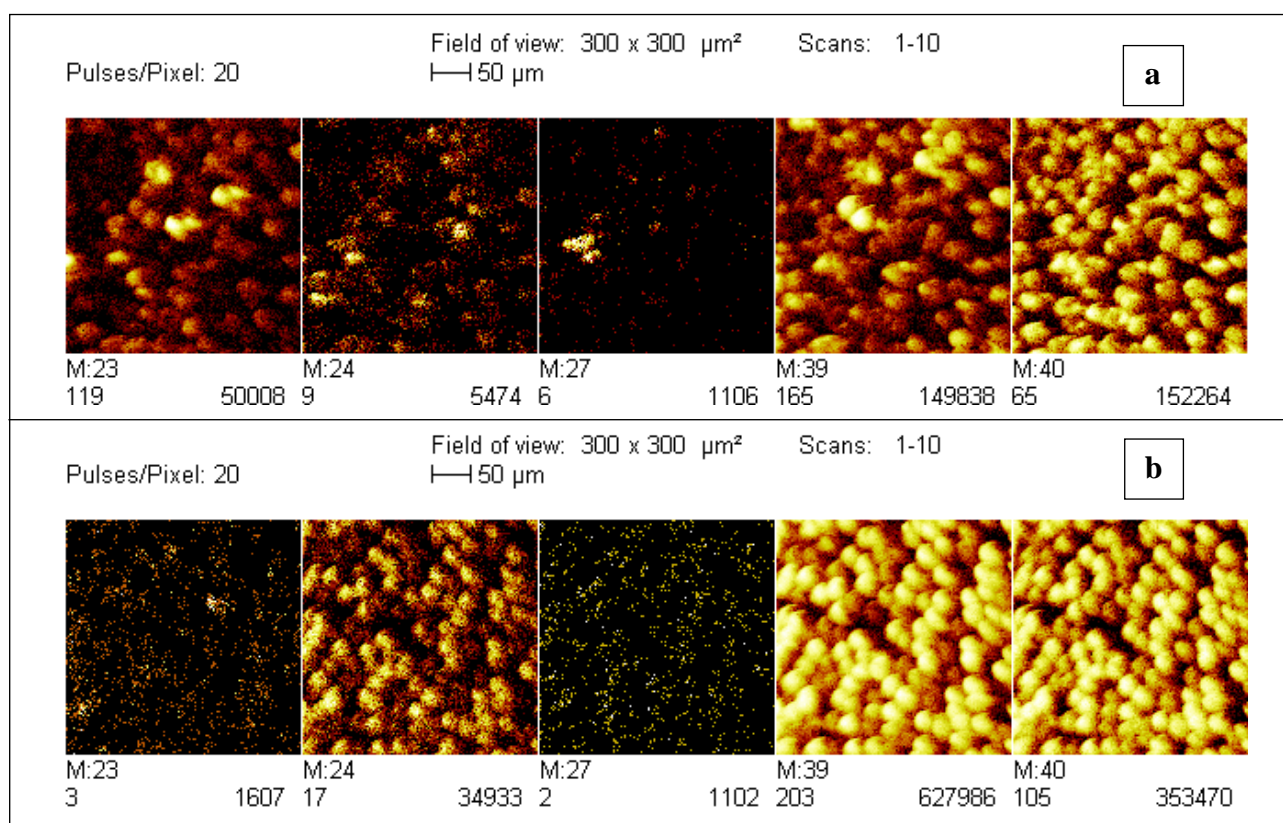


Fig. 6. Intensità dei segnali degli elementi maggioritari (nell'ordine: ^{23}Na , ^{24}Mg , ^{27}Al , ^{39}K , ^{40}Ca) nel campione di *Corylus avellana* prelevato nella stazione A1 (a) e N1 (b); l'intensità è rappresentata in scala cromatica.

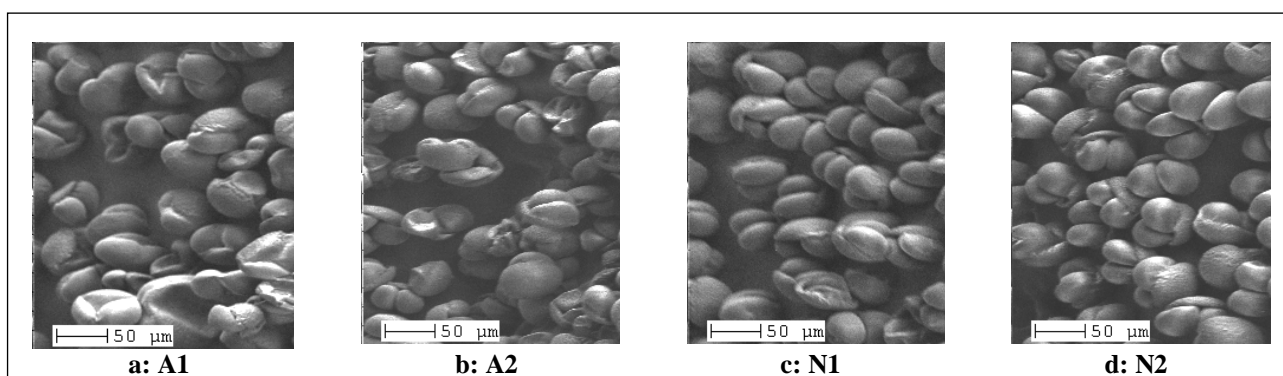


Fig. 7. Immagini morfologiche (secondary electron image) dei pollini di *Pinus nigra*.

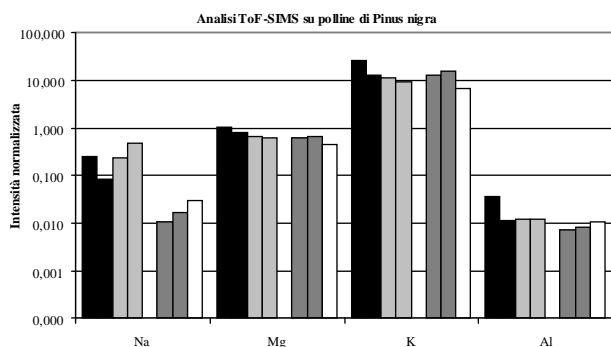


Fig. 8. Intensità dei segnali degli elementi maggioritari (normalizzate rispetto all'intensità del segnale di ^{40}Ca) nei campioni di *Pinus nigra*: A1 (nero), A2 (grigio scuro), N1 (punteggiato), N2 (bianco).

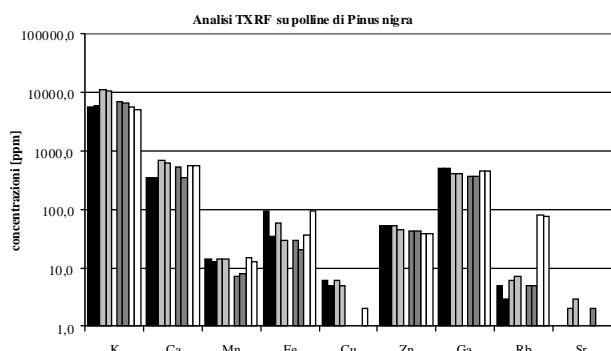


Fig. 9. Concentrazioni degli elementi rilevati con analisi TXRF nei campioni di polline di *Pinus nigra*: A1 (nero), A2 (grigio scuro), N1 (punteggiato), N2 (bianco).

concentrazioni medie di calcio, manganese, ferro, rame, zinco e stronzio sono tendenzialmente maggiori per *C. avellana* rispetto a *P. nigra*.

È interessante inoltre notare che anche per il polline di *P. nigra* il tenore relativo di sodio è decisamente superiore per i campioni prelevati nei siti a maggiore impatto antropico ($p < 0,1$) (Fig. 8); per questi ultimi, l'analisi TXRF mette in evidenza concentrazioni di rame e zinco significativamente superiori ($p < 0,05$) rispetto ai campioni provenienti dalle zone naturali.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati ottenuti, il polline di *B. pendula* sembra essere poco adatto a rappresentare

attraverso la sua vitalità la situazione dell'ambiente in cui si trova la pianta; anche per quanto riguarda la caratterizzazione chimico-fisica, l'impiego di questo polline è tendenzialmente da escludere per la presenza di particelle estranee. Altri studi (IANNOTTI *et al.*, 2000) hanno evidenziato che non tutti i tipi di polline sono adatti come bioindicatori; alcune piante, ad esempio la parietaria, sembrano infatti ben adattate a situazioni di inquinamento poiché il loro polline ha mostrato il massimo di vitalità in aree ad alto traffico veicolare. Il polline di altre specie (es. *Tilia cordata*) si è invece rivelato maggiormente idoneo ad essere usato come bioindicatore perché più sensibile agli inquinanti atmosferici.

I pollini di *C. avellana* e *P. nigra* hanno mostrato un insieme di caratteristiche interessanti. Le analisi biologiche hanno infatti evidenziato una vitalità statisticamente più elevata nelle stazioni naturali rispetto a quelle alterate prese in considerazione, confermando i risultati di una precedente indagine (GOTTARDINI e CRISTOFOLINI, in stampa) e quanto già osservato da altri autori (CALZONI *et al.*, 1994). Rispetto ai campioni raccolti nell'area di riferimento (naturale), quelli provenienti da una situazione antropizzata hanno inoltre mostrato alterazioni morfologiche e una maggior presenza di alcune specie chimiche (alluminio, piombo, rame, sodio, zinco). Anche altri autori (OLEKSYN *et al.*, 1998) hanno rilevato concentrazioni più elevate di alcuni elementi (S, Mn, Al, Na, Cu, Ni e Cd) in polline di *Pinus sylvestris* proveniente da siti inquinati rispetto a quelli di controllo.

L'indagine ToF-SIMS, benché preliminare, ha evidenziato alcuni elementi di sicuro interesse; un aspetto importante è la possibilità di ottenere dati spazialmente risolti, cosicché possono essere evidenziate le caratteristiche individuali dei singoli granuli e può essere quantificato il contributo associato alla eventuale presenza di particelle estranee. Il metodo TXRF, semplice e di veloce esecuzione, in alcuni casi non sarebbe però sufficientemente sensibile per il rilevamento di importanti elementi in traccia, con concentrazioni approssimativamente attorno a 0,1 ppm (KUMP *et al.*, 1996). Un aspetto importante di queste due tecniche analitiche è che entrambe necessitano di quantitativi di materiale dell'ordine del μg ; tale caratteristica si rivela molto importante per la natura dei campioni considerati nel presente lavoro.

Bibliografia

ALAIMO M. G., MELATI M.R., ORECCHIO S., DE VITA F., 1996. Effetti fitotossici da metalli pesanti sui pollini di piante forestali. In: *Abstracts VII Congresso Nazionale dell'Associazione Italiana di Aerobiologia*: 174.

ALAIMO M. G., PALMERI E., BRUNO A., MELATI M.R., 1998. Proposal for the evaluation of stress caused by environmental

- pollution with plant markers. In: *Abstracts 6th International Congress on Aerobiology*: 85.
- BARGAGLI R., NIMIS P. L., MONACI F., 1997. Lichen biomonitoring of trace element deposition in urban, industrial and reference areas of Italy. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **11**: 173-175.
- BELLANI L. M., PAOLETTI E., CENNI E., 1988. Air pollution effects on pollen germination of forest species. In: Cresti, Gori, Pacini (eds.), *Sexual Reproduction in Higher Plants*: 265-270.
- BENNINGHOVEN A., 1985. Static SIMS application – From silicon single crystal oxidation to DNA sequencing. *J. Vac. Sci. Technol. A* **3**(3): 451-460.
- CALZONI G. L., CASTELLANI E., GIANI P., MANDRIOLI P., SPERANZA A., 1994. Qualità del polline di nocciolo in differenti condizioni fenologiche e ambientali. In: *Abstracts 6° Congresso Nazionale dell'Associazione Italiana di Aerobiologia*: 55.
- CASTELLO M., CENCI R. M., GERDOL R., 1999. Proposte metodologiche per l'uso di briofite come bioaccumulatori di metalli in traccia. In: *Atti del Workshop "Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale"*. Roma, 26-27 novembre 1998. ANPA - Serie Atti, 2/1999: 233-240.
- CELARENZONI G., VIEGI L., STEFANI A., ONNIS A., 1990. Different *in vitro* germination responses in *Pinus pinea* pollen from two localities with different levels of pollution. *Ann. Bot. Fennici*, **27**: 85-90.
- CISLAGHI C., NIMIS P. L., 1997. Lichens, air pollution and lung cancer. *Nature*, **387**: 463-464.
- COMTOIS P., 1994. Airborne pollen dispersal and survival on Mount Sutton (Canada). *Aerobiologia*, **10**: 31-37.
- COMTOIS P., PERFETTO A., 1996. Airborne pollen viability: meteorological and air pollution determinants. In: *Atti del VII Congresso Nazionale dell'Associazione Italiana di Aerobiologia*, Firenze: 97.
- COMTOIS P., SCHEMENAUER R., S., 1991. Tree pollen viability in areas subject to high pollutant deposition. *Aerobiologia*, **7**: 144-151.
- FLÜCKIGER W., BRAUN S., OERTLI J. J., 1978. Der Einfluss verkehrsbedingter Luftverunreinigungen auf die Keimung und das Schlauchwachstum bei Pollen von *Nicotiana sylvestris*. *Environ. Pollut.*, **16**: 73-80.
- GOTTARDINI E., CRISTOFOLINI F., 2002. Studio della biodiversità dei licheni epifiti nel comune di Trento. *Acqua Aria*, **7**: 83-88.
- GOTTARDINI E., CRISTOFOLINI F., (in stampa). Analisi della vitalità pollinica come possibile tecnica di bioindicazione della qualità dell'aria. Atti Seminario "Nuovi orizzonti dell'ecologia", Trento, 18-19 aprile 2002.
- IANNOTTI O., MINCIGRUCCI G., BRICCHI E., FRENGUELLI G., 2000. Pollen viability as a bio-indicator of air quality. *Aerobiologia*, **16**: 361-365.
- KELLER T., BEDA H., 1984. Effects of SO₂ on germination of conifer pollen. *Environ. Pollut.*, **33**: 237-243.
- KRISTEN U., 1997. Use of higher plants as screens for toxicity assessment. *Toxicology in Vitro*, **11**: 181-191.
- KUMP P., NECEMER M., SNAJDER J., 1996. Determination of trace elements in bee honey, pollen and tissue by total reflection and radioisotope X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta*, **51**: 499-507.
- LOPPI S., GIOVANNELLI L., FRANCHI F. C., LIMBERTI A., TACCONI C., FRANCALANCI C., MARCHI G., CAPORALI B., PANCINI P., CORSINI A., BRUSCOLI C., 1996. Bioindicazione della qualità dell'aria tramite licheni: esperienze in Toscana. *Acqua Aria*, **7-8**: 707-713.
- LOPPI S., IVANOV D., BOCCARDI R., 2002. Biodiversity of epiphytic lichens and air pollution in the town of Siena (Central Italy). *Environ. Pollut.*, **116**: 123-128.
- LORENZINI G., 1999. *Le piante e l'inquinamento dell'aria*. Edagricole, 335 pp.
- NIMIS P. L., 1999. Linee-guida per la bioindicazione degli effetti dell'inquinamento tramite la biodiversità dei licheni epifiti. In: *Atti del Workshop "Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale"*. Roma, 26-27 novembre 1998. ANPA - Serie Atti, 2/1999: 267-277.
- OLEKSYN J., REICH P. B., KAROLEWSKI P., TJOELKER M. G., CHALUPKA W., 1998. Nutritional status of pollen and needles of diverse *Pinus sylvestris* populations grown at sites with contrasting pollution. *Water, Air and Soil Pollut.*, **110**: 195-212.
- ONORARI M., DOMENEGHETTI M. P., FILIPPELLI N., CIUTI P., MAGRINI S., 2000. Pollini e inquinamento atmosferico. In: *Abstracts IX Congresso Nazionale A.I.A. "Ambiente e Prevenzione"*. Cagliari, 5-8 ottobre.
- PAOLETTI E., 1990. Germinazione in vitro di polline di specie del genere *Quercus* sottoposto a trattamenti con acidi o tensioattivi. *Giorn. Bot. Ital.*, **124/1**: 227.
- PORRINI C., 1999. Metodologia impiegata nei programmi di monitoraggio dei pesticidi con api. In: *Atti del Workshop "Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale"*. Roma, 26-27 novembre 1998. ANPA - Serie Atti, 2/1999: 311-317.
- RUFFIN J., WILLIAM D., BANERJEE U., PINNIX K., 1983. The effects of some environmental gaseous pollutants on pollen-wall proteins of certain pollen grains. A preliminary study. *Grana*, **22**: 171-175.
- SHIVANNA K. R., RANGASWAMY N. S., 1992. *Pollen Biology. A Laboratory Manual*. Springer-Verlag, 119 pp.
- SIDHU S. S., 1983. Effects of simulated acid rain on pollen germination and pollen tube growth of white spruce (*Picea glauca*). *Can. J. Bot.*, **61**: 3095-3099.
- VAN RYN D. M., JACOBSON J. S., LASOIE J. P., 1986. Effects of acidity on *in vitro* pollen germination and tube elongation in four hardwood species. *Can. J. For. Res.*, **16**: 397-400.
- VICKERMAN J. C., BRIGGS D. (eds), 2001. *ToF-SIMS Surface Analysis by Mass Spectrometry*, IM Publications and Surface Spectra Ltd, ISBN: 1 901019 03 9
- WOLTERS J. H. B., MARTENS M. J. M., 1987. Effects of air pollutants on pollen. *Bot. Rev.*, **53**: 372-414.